

<令和5年度助成>

香辛料抽出物の抗炎症作用による ベージュ脂肪細胞熱産生阻害の回復を介した抗肥満作用の解析

高橋 信之

(東京農業大学 応用生物科学部)

1. 研究背景

ベージュ脂肪細胞は、通常、白色脂肪細胞と同様に過剰なエネルギーを脂肪として蓄える働きをするが、寒冷刺激などによる交感神経活性化により、蓄えた脂肪を消費し、得られたエネルギーをミトコンドリアの脱共役タンパク質1 (UCP-1) によって熱に変換する熱産生細胞となる。UCP-1 による熱産生は脂肪が持つ過剰なエネルギーを熱にすることから、熱産生を伴うベージュ脂肪細胞の活性化は抗肥満につながる可能性があり、近年、食品科学の分野において、ベージュ脂肪細胞を活性化する食品成分の同定とその機能解析が広く行われている。

申請者はこれまでベージュ脂肪細胞での *UCP-1* 発現誘導が、肥満に伴う脂肪組織での慢性炎症によって阻害されることを見出した (Am. J. Physiol., 2013, C729-738, Am. J. Physiol., 2016, 310, E676-687)。肥満状態の脂肪組織では、肥大化した白色脂肪細胞から分泌される MCP-1 によって血中マクロファージが浸潤し、同じく肥大化脂肪細胞から放出される遊離脂肪酸により活性化されることで、慢性炎症が惹起される。この慢性炎症は白色脂肪細胞のインスリン感受性を低下させ、糖尿病の原因となり得ることが報告されている。さらに、脂肪組織中の活性化マクロファージから分泌される $\text{TNF}\alpha$ (Am. J. Physiol., 2013, C729-738) や $\text{IL-1}\beta$ (Cytokine, 2016, 77, 107-114) といった炎症性サイトカインがベージュ脂肪細胞での *UCP-1* 発現誘導を阻害し、熱産生能を低下させることをこれまで報告してきた。

そこで申請者は、これまで報告されているベージュ脂肪細胞での *UCP-1* 発現増加という直接的な作

用だけではなく、抗炎症作用という間接的な作用によって、炎症によって抑制された *UCP-1* の発現を回復させることができるのではないかと考え、細胞レベルの評価系を構築した。本研究では、市販の香辛料の熱水抽出物の抗炎症作用を評価するとともに、新たに構築した評価系を用い、これまでに報告されていなかった、ベージュ脂肪細胞での *UCP-1* 発現誘導阻害の回復を介した抗肥満効果を見出すことを目的とする。

2. 研究方法

本研究では、(1) 市販の香辛料から熱水抽出物を調製し、その抗炎症作用を評価する、(2) 抗炎症作用が認められた抽出物について、新たに構築した評価系を用い、ベージュ脂肪細胞での *UCP-1* 発現誘導阻害の回復を評価する、という2つの実験からなる。

(1) 熱水抽出物の調製と抗炎症作用の評価

日々の食事による抗肥満効果を想定しているため、本研究で使用したスパイス粉末サンプルはスーパーマーケットで購入可能なものに限定した。既に抗炎症作用が報告されているものも含め、27種類のスパイスをスーパーマーケットで購入した (表1)。この27種類のスパイス粉末サンプルについて、図1の調製方法に従い、熱水抽出物を調製した。

各スパイス熱水抽出物の抗炎症作用の評価には、リポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS) など炎症誘導剤により活性化される転写調節因子である $\text{NF-}\kappa\text{B}$ および AP-1 の活性をルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現で評価するレポーターアッセイを用いた。

表1 本研究で使用したスパイス粉末サンプル

| No. | スパイス | 販売会社名 | 産地 |
|-----|-----------|-------------------------|--------|
| 1 | オレガノ | 株式会社スパイスハウス | トルコ |
| 2 | セージ | ハウスギャバン株式会社 | ギリシャ |
| 3 | タイム | ハウスギャバン株式会社 | モロッコ |
| 4 | バジル | エスビー食品株式会社 | エジプト |
| 5 | ペパーミント | エスビー食品株式会社 | エジプト |
| 6 | マジョラム | エスビー食品株式会社 | エジプト |
| 7 | ローズマリー | エスビー食品株式会社 | アルバニア |
| 8 | アジョワン | 株式会社ビスワス | インド |
| 9 | キャラウェイ | 株式会社キャメル珈琲 | オランダ |
| 10 | クミン | ハウスギャバン株式会社 | マレーシア |
| 11 | コリアンダー | Ambika Corporation Ltd. | インド |
| 12 | ディルウィード | 株式会社キャメル珈琲 | アメリカ |
| 13 | パセリ | エスビー食品株式会社 | フランス |
| 14 | フェンネル | エスビー食品株式会社 | インド |
| 15 | ブラックペッパー | ハウスギャバン株式会社 | マレーシア |
| 16 | ホワイトペッパー | ハウスギャバン株式会社 | マレーシア |
| 17 | カルダモン | Ambika Corporation Ltd. | インド |
| 18 | ターメリック | ハウスギャバン株式会社 | マレーシア |
| 19 | イエローマスタード | Ambika Corporation Ltd. | インド |
| 20 | シナモン | ハウスギャバン株式会社 | スリランカ |
| 21 | ポピーシード | ヤスマ株式会社 | トルコ |
| 22 | レッドペッパー | ハウスギャバン株式会社 | 中国 |
| 23 | ナツメグ | ハウスギャバン株式会社 | インドネシア |
| 24 | ジュニパーベリー | 朝岡スパイス株式会社 | 不明 |
| 25 | クローブ | エスビー食品株式会社 | インドネシア |
| 26 | 花椒 | ハウスギャバン株式会社 | 中国 |
| 27 | スターアニス | 株式会社スパイスハウス | インド |

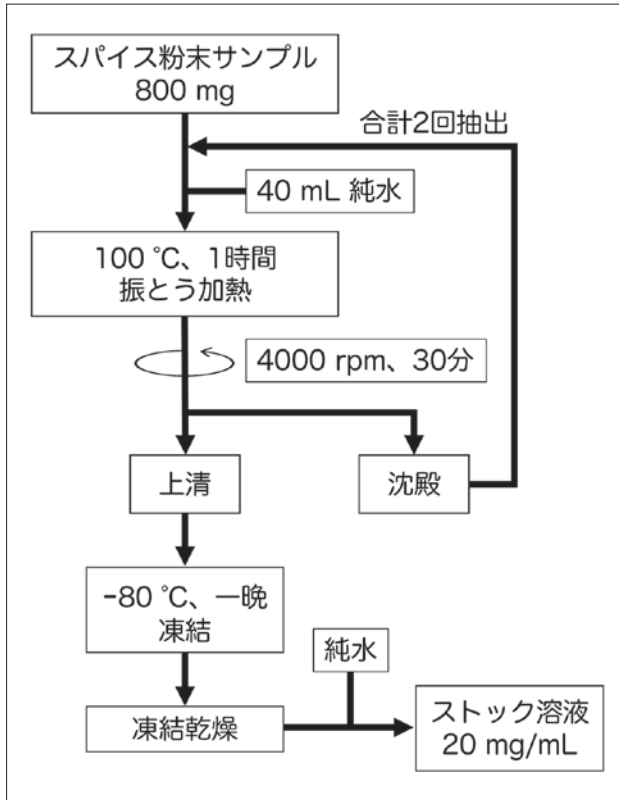


図1 スパイス熱水抽出物の調製方法

レポーターアッセイで抗炎症作用が示唆された抽出物については、実際にマクロファージの活性化を抑制するかどうか、炎症時にマクロファージにおいて発現が誘導される炎症マーカー遺伝子の mRNA 発現を定量的 PCR 法にて評価した。

(2) ベージュ脂肪細胞での *UCP-1* 発現誘導阻害回復作用の評価

食品成分の抗炎症作用による *UCP-1* 発現回復は、マクロファージとベージュ脂肪細胞の両方を用いて評価する必要がある。そこで、申請者は活性化マクロファージの培養上清をベージュ脂肪細胞に添加し、マクロファージの活性化による *UCP-1* 発現抑制を評価できる実験系を構築した (図2)。活性化マクロファージの培養上清には、ベージュ脂肪細胞での *UCP-1* 発現を抑制する $\text{TNF}\alpha$ や $\text{IL-1}\beta$ などの炎症性サイトカインが含まれている。しかし食品成分に抗炎症作用があれば、炎症誘導剤である LPS によるマクロファージ刺激時に添加することで、マクロファージの活性化が抑えられ、培養上清中の炎症性サイトカインのタンパク質量増加が抑制される。その抑制作用が実際にベージュ脂肪細胞での *UCP-1* 発現阻害を回復しうるレベルにあるか、ベージュ脂肪細胞に培養上清を添加し、アドレナリン刺激することで誘導される *UCP-1* 発現を定量的 PCR 法にて検討した。

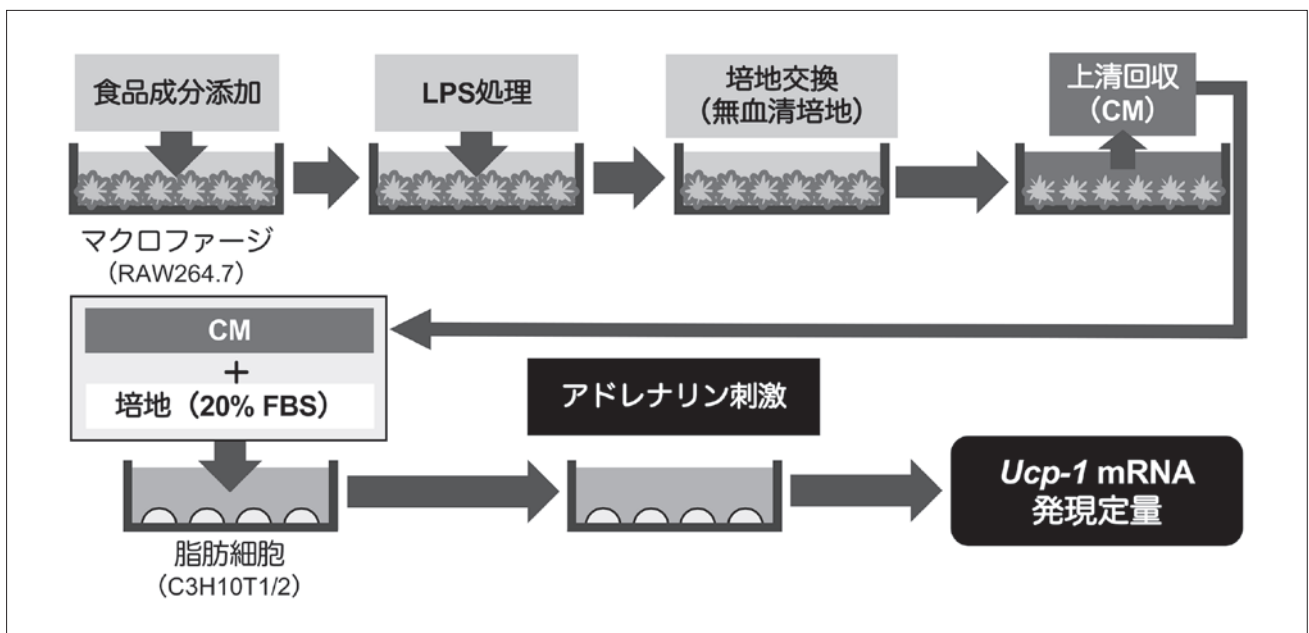


図2 マクロファージ培養上清を用いた抗炎症作用を持つ食品成分の間接的作用の評価系

3. 研究結果

(1) 熱水抽出物の調製と抗炎症作用の評価

まず、調製したスパイス熱水抽出物それぞれについて、マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に対する毒性試験を実施し、細胞毒性が観察されない濃度

範囲を決定した（データ未記載）。その濃度範囲で、LPS 刺激により上昇した転写調節因子 NF- κ B ならびに AP-1 の活性をどの程度抑えるかという指標のもと、ルシフェラーゼレポータシステムを用いて、スパイス熱水抽出物の抗炎症作用を評価した（図 3）。その結果、複数のスパイス熱水抽出物に LPS 刺激に

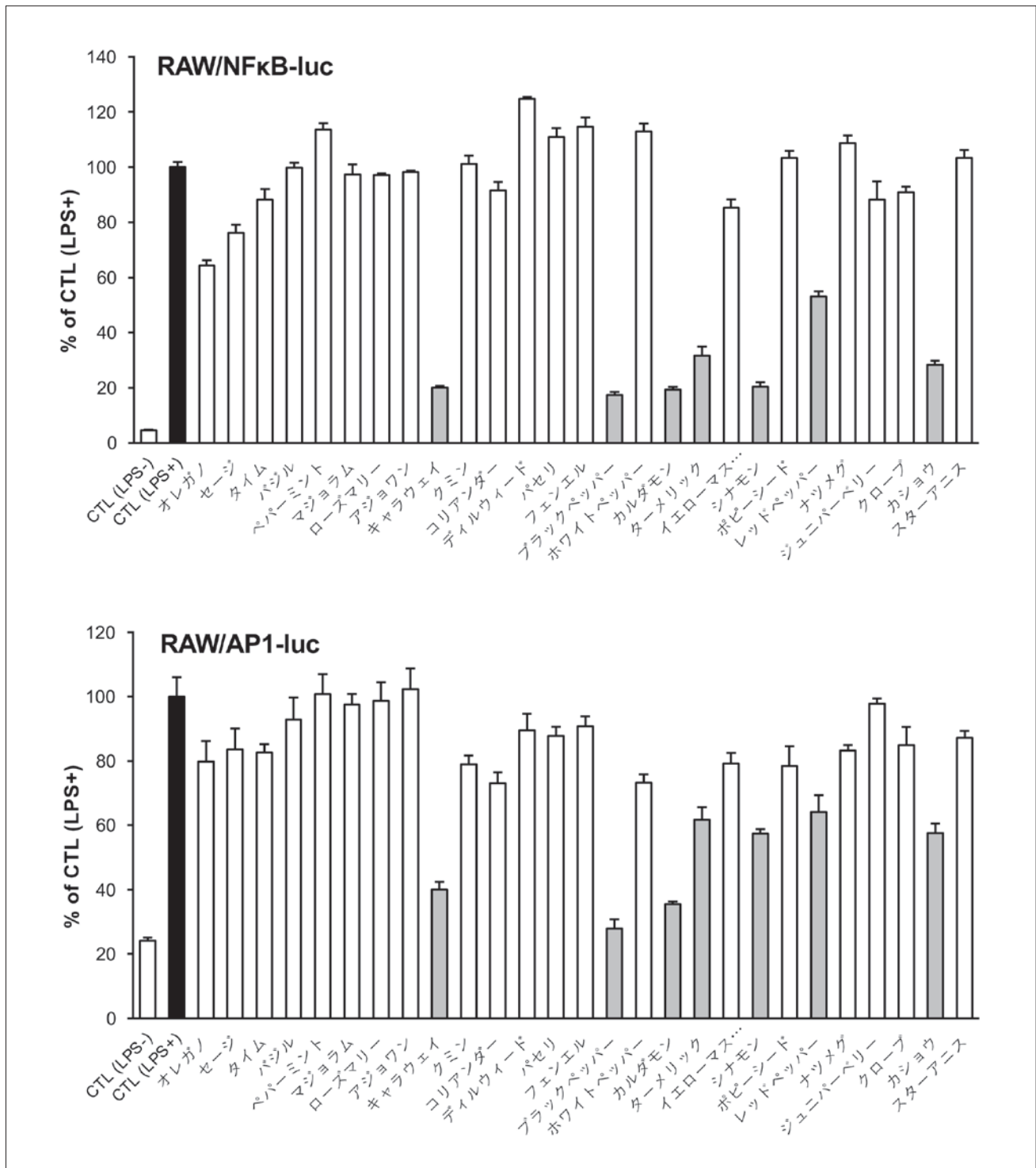


図3 ルシフェラーゼアッセイによるスパイス熱水抽出物の抗炎症作用の評価

よる NF- κ B/AP-1 活性化を抑制する強い作用が認められ、LPS 刺激によるマクロファージの活性化の抑制、すなわち抗炎症作用があることが示唆された。

抗炎症作用が示唆された熱水抽出物の中で、キャラウェイ、ブラックペッパー、カルダモン、ターメリック、シナモン、レッドペッパー、そしてカシヨウ（花椒）に、NF- κ B 活性と AP-1 活性のいずれをも強く抑える作用が認められた（図 3 のグレーで示したサンプル）。ブラックペッパー、ターメリック、シナモン、レッドペッパーについては、既に抗炎症作用や活性化化合物が詳細に調べられており、ピペリン、クルクミン、シンナムアルデヒド、カプサイシンがそれぞれ熱水抽出物に含まれていることが HPLC 分析により明らかとなったため（データ未記載）、まずは、抗炎症作用について詳細な検討が行われていない、キャラウェイ、カルダモン、カシヨウを用いて実験を行った。LPS 刺激により誘導される炎症マーカー遺伝子の mRNA 発現レベルを定量的 PCR 法にて検討した結果、キャラウェイ、カルダモン、カシヨウいずれのスパイス熱水抽出物も、炎症マーカー遺伝子である *TNF α* 、*IL-1 β* 、*IL-6* の mRNA

発現を抑制し、抗炎症作用を持つことが示された（図 4）。

(2) ベージュ脂肪細胞での *UCP-1* 発現誘導阻害回復作用の評価

遺伝子発現解析を行った炎症マーカーの中で、*TNF α* と *IL-1 β* は、ベージュ脂肪細胞におけるアドレナリン刺激による *UCP-1* 発現誘導を抑えることが明らかとなっているため、キャラウェイ、カルダモン、カシヨウのいずれについても、炎症によるベージュ脂肪細胞での *UCP-1* 発現誘導阻害を回復させる間接的作用が期待される。そこで、スパイス熱水抽出物で処理したマクロファージの培養上清をベージュ脂肪細胞に添加し、キャラウェイ、カルダモン、カシヨウの間接的作用を検討した（図 5）。

図 5 の実験では、ベージュ脂肪細胞に複数種類の培養上清を添加している。CTL、ISO- および CTL、ISO+ のベージュ脂肪細胞には何も処理していないマクロファージの培養上清を、LPS+ には LPS 処理により活性化したマクロファージの培養上清を、LPS+ で濃度表示があるベージュ脂肪細胞にはそれぞれの

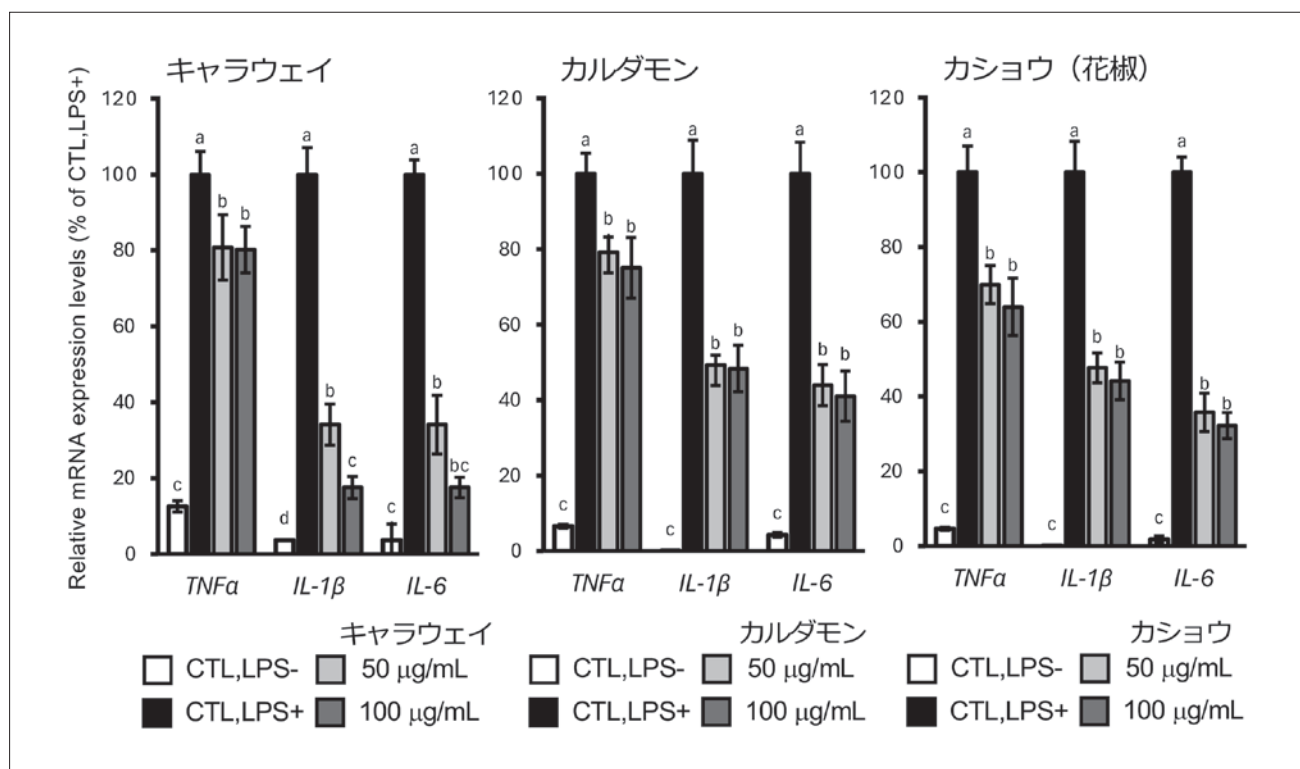


図 4 炎症マーカー遺伝子の mRNA 発現解析によるスパイス熱水抽出物の抗炎症作用の評価

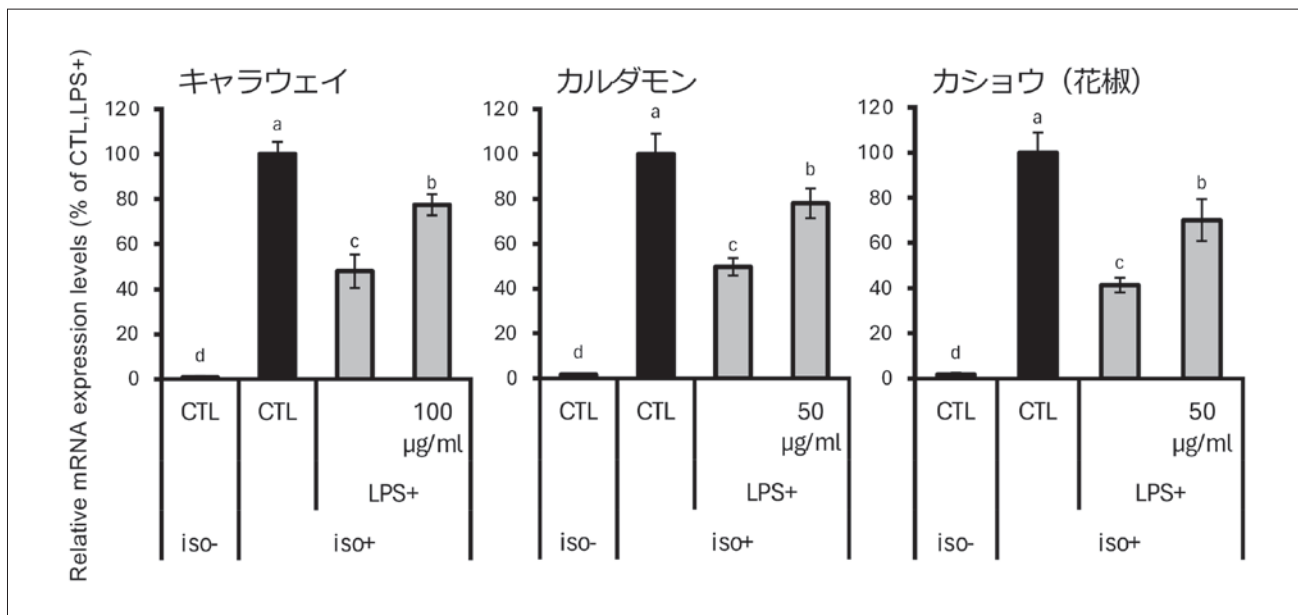


図5 マクロファージ培養上清を用いた抗炎症作用を持つ食品成分の間接的作用の評価系

スパイス熱水抽出物とLPSで共処理したマクロファージの培養上清を、それぞれ添加し、*UCP-1* 発現を誘導するため、アドレナリン類似物質であるイソプレテレンール (ISO) で処理した。図5記載のいずれのグラフにおいても、アドレナリン刺激をしてない状態 (CTL, ISO-) からアドレナリン刺激を行うことで *UCP-1* 発現が誘導されている (CTL, ISO+)。このとき、LPS 処理によって活性化させたマクロファージの培養上清を添加しておく、その培養上清中には *UCP-1* 発現を抑制する $TNF\alpha$ と $IL-1\beta$ が含まれているため、アドレナリン刺激による *UCP-1* 発現が阻害される (LPS+)。一方で、LPS 刺激の際にスパイス熱水抽出物を添加しておく、マクロファージ活性化が抑制され、その結果として培養上清中の $TNF\alpha$ と $IL-1\beta$ の量が減少するため、アドレナリン刺激時の *UCP-1* 発現誘導阻害が解除され、*UCP-1* 発現量が増加する (LPS+、濃度表示あり)。この *UCP-1* 発現誘導阻害回復作用は、検討したキアラウェイ、カルダモン、カシヨウのいずれにおいても観察されたため、これらスパイス熱水抽出物には、炎症によって阻害される *UCP-1* 発現を回復させる間接的作用があることが示された。

4. 考察

本研究において、複数のスパイス熱水抽出物にマクロファージ活性化を抑制する抗炎症作用が確認された。ヘキサンのような有機溶媒により抽出される脂溶性化合物については、様々なスパイスにおいて抗炎症作用が既に報告されている。例えば、ターメリックに含まれるクルクミン、レッドペッパーに含まれるカプサイシンなどが代表的である。またブラックペッパーに含まれるピペリンについては、申請者のグループでも抗炎症作用を確認している。しかし、主に水溶性化合物が抽出されると思われる熱水抽出物により得られる化合物については、抗炎症作用に関する研究がほとんど報告されていなかった。本研究では、そうしたスパイスの熱水抽出物に抗炎症作用を見出した点で、大きな成果が得られたと考えている。一方で、熱水抽出物の HPLC 分析において、クルクミンやカプサイシンといった脂溶性化合物が一部含まれていたため、そうした脂溶性化合物が含まれないよう、まず有機溶媒により脂溶性化合物を抽出し、その残渣を冷水抽出するなどの方法で、脂溶性化合物と水溶性化合物とを完全に分離し、抗炎症作用を評価する検討も必要であると考えられる。

本研究では、スパイスの熱水抽出物の抗炎症作用

の評価に加えて、マクロファージ活性化により阻害される、ベージュ脂肪細胞での熱産生能の評価も実施した。今回、キャラウェイ、カルダモン、カシウの3つの熱水抽出物だけの評価したが、活性化マクロファージの培養上清を用いた実験系において、いずれの抽出物についても、マクロファージ活性化を抑える抗炎症作用を介して、ベージュ脂肪細胞での *UCP-1* 発現誘導阻害を回復させた。この、マクロファージの活性化を抑制することでベージュ脂肪細胞の熱産生能を回復させる、いわゆる「間接的作用」は、スパイス成分については、これまでに報告はなく、本研究において初めて示されたスパイスの新しい生理作用である。今後は、本研究では計画されていたものの実施することができなかった、肥満糖尿病モデルマウスを用いた動物実験を実施し、細胞だけでなく動物レベルにおいても、スパイス熱水抽出物が間接的作用を示すかどうか明らかにするとともに、

抗炎症作用が認められた他のスパイス熱水抽出物についても、間接的作用の評価をする必要がある。そのような評価を行うことで、効率的な脂肪消費につながる *UCP-1* 発現回復を介した抗肥満作用という、スパイスの新たな付加価値が見出されることが期待される。

謝 辞

本研究に対して、多大な助成をいただきました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団およびその関係者の皆様に厚くお礼申し上げます。また本研究で得られたデータは、東京農業大学応用生物科学研究科 食品安全健康学専攻の博士後期課程3年・高橋尚子さん（現 明治大学農学部博士研究員）、博士前期課程2年・富島七海さんが実施した実験によるものです。この場を借りて、深く感謝いたします。

Indirect effects of anti-inflammation and thermogenesis-restoration of spice hot water extracts in beige adipocytes

Nobuyuki TAKAHASHI

*Department of Food Safety and Nutritional Science, Faculty of Applied Bioscience,
Tokyo University of Agriculture*

This study examined the potential of spice hot water extracts to restore thermogenic function in beige adipocytes through anti-inflammatory mechanisms. Beige adipocytes promote lipid consumption and heat production via UCP-1-mediated thermogenesis under sympathetic stimulation. However, obesity suppresses this process due to chronic inflammation driven by activated macrophage-derived cytokines, such as TNF- α and IL-1 β . Using an experimental system in which UCP-1 expression was suppressed via macrophage-conditioned media, 27 spice extracts were screened for anti-inflammatory effects using NF- κ B and AP-1 reporter assays. Extracts from caraway, cardamom, and Sichuan pepper showed potent inhibitory activities and reduced inflammatory gene expression in macrophages. These extracts also mitigated the suppression of UCP-1 induction in beige adipocytes exposed to inflammatory conditioned media. These findings suggest that the water-soluble components in certain spices can indirectly restore beige adipocyte thermogenesis by reducing macrophage-mediated inflammation. This offers a potential novel obesity management strategy.